

# 柱前衍生高效液相色谱法测定功能饮料中牛磺酸含量的条件优化

周欣蕊<sup>1,2</sup>, 王婷<sup>1,2</sup>, 林楠<sup>1,2</sup>, 华蕾<sup>1</sup>, 王庆峰<sup>1</sup>, 金昱言<sup>1,2\*</sup>

(1. 吉林省食品检验所, 长春 130103; 2. 吉林省安信食品技术服务有限公司, 长春 130033)

**摘要:** **目的** 优化柱前衍生高效液相色谱条件检测功能饮料中牛磺酸的含量。**方法** 采用配备紫外检测器的高效液相色谱仪, 利用 C<sub>18</sub> 反相色谱柱, 选择甲醇:乙酸钠=45:55(V:V)为流动相, 在流速为 0.8 mL/min、标液与衍生试剂比例为 1:1(V:V)、衍生时间为 1 h 时进行检测。**结果** 在 1.0~200 μg/mL 范围内, 牛磺酸的浓度与峰面积呈现良好的线性, 标准曲线方程是  $Y=34182X+14599$ ,  $r^2=0.9999$ , 优化后的方法回收率在 96.83%~100.17%之间, 检出限是 0.53 mg/100 g, 定量限为 1.76 mg/100 g。**结论** 本方法高效、准确, 适用于功能饮料中牛磺酸含量的检测, 为日常监管工作提供理论支持。

**关键词:** 牛磺酸; 高效液相色谱法; 功能饮料

## Optimization of the method for determination of taurine in functional drinks by high performance liquid chromatography with precolumn derivatization

ZHOU Xin-Rui<sup>1,2</sup>, WANG Ting<sup>1,2</sup>, LIN Nan<sup>1,2</sup>, HUA Lei<sup>1</sup>, WANG Qing-Feng<sup>1</sup>, JIN Yu-Yan<sup>1,2\*</sup>

(1. Jilin Institute for Food Control, Changchun 130103, China; 2. Jilin Anxin Food Technology Services Limited Company, Changchun 130033, China)

**ABSTRACT: Objective** To optimize the conditions of high performance liquid chromatography (HPLC) with precolumn derivatization for determination of taurine content in functional drinks. **Methods** The samples were determined by HPLC with ultraviolet detector, using C<sub>18</sub> reversed phase as chromatograph column. The mobile phase was methanol and sodium acetate (45:55, V:V), with the flow rate of 0.8 mL/min, the ratio of standard solution and derivatization of 1:1, and the derivatization time of 1 h. **Results** When the concentration of taurine ranged from 1.0 to 200 μg/mL, the concentration of taurine and peak area had a good correlation. The standard curve equation was  $Y=34182X+14599$ ,  $r^2=0.9999$ . The recoveries of the optimized method were 96.83%-100.17%. The limit of detection was 0.53 mg/100 g and the limit of quantitation was 1.76 mg/100 g. **Conclusion** The method is efficient and accurate, and is suitable for detecting the content of taurine in functional drinks, so as to provide theoretical support for daily supervision work.

**KEY WORDS:** taurine; high performance liquid chromatography; functional drinks

\*通讯作者: 金昱言, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。E-mail: 270327349@qq.com

\*Corresponding author: JIN Yu-Yan, Assistant Engineer, Jilin Institute for Food Control, Changchun 130033, China. E-mail: 270327349@qq.com

## 1 引言

牛磺酸是一种特殊的含硫氨基酸,广泛存在于动物的体内,是人体生长发育所必需的一种氨基酸。牛磺酸有助于保护视网膜、心肌,可以提高人体的免疫力、抗氧化以及促进脂类吸收等功能。所以在保健食品和医药等领域应用广泛。我国在 1993 年批准在婴幼儿食品、谷类制品、乳制品及强化饮料中可以适量添加牛磺酸作为营养补充剂。在一些功能性饮料中适当加入牛磺酸可以达到保健的功效,如若过量也会造成人体内营养失衡。目前市售的功能性饮料参差不齐,对于建立有效、简便和准确的牛磺酸测定方法是非常有必要的<sup>[1-3]</sup>。

目前牛磺酸测定的方法有酸碱滴定法<sup>[4]</sup>、薄层色谱法<sup>[5]</sup>、高效液相色谱法<sup>[6-8]</sup>、离子色谱法<sup>[9]</sup>、电位滴定法<sup>[10]</sup>、液相色谱-串联质谱法<sup>[11]</sup>、毛细管电泳法<sup>[12]</sup>、氨基酸分析仪测定法<sup>[13]</sup>等。酸碱滴定法和薄层色谱法虽然很经济但是特异性和灵敏度都很低,不能精准测量;离子色谱法普及性不是很高;毛细管电泳法操作不是很简便,用的范围也不是很广;液相色谱-串联质谱法通常适用于痕量分析;氨基酸分析仪灵敏度很高,选择性好但是测定所需要的时间较长,仪器价格高;高效液相色谱法对于样品的前处理较简单,可以快速检测,所以被应用广泛<sup>[14]</sup>。根据衍生试剂以及衍生方式不同可分为异硫氰酸苯酯衍生法<sup>[15]</sup>、丹磺酰氯衍生法<sup>[16]</sup>和邻苯二甲醛衍生法<sup>[17]</sup>,目前关于丹磺酰氯柱前衍生法用于功能饮料中牛磺酸含量检测的研究相对较少。本文主要研究的是丹磺酰氯柱前衍生法,在 GB 5009.169-2016 食品安全国家标准 食品中牛磺酸的测定的基础上进行实验条件的优化<sup>[18]</sup>,并用该方法检测了不同批次的功能饮料中牛磺酸的含量,为日常相关部门抽检监管工作提供参考。

## 2 材料与方 法

### 2.1 仪器与试剂

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津公司); AB204-N 电子天平(瑞士梅特勒托利多仪器有限公司); Milli-Q 超纯水制备系统(德国默克密理博公司); VORTEX 天才 2 涡旋振荡器(广州仪科实验室技术有限公司); Microfuge 20 高速台式离心机(美国 Beckman 公司); ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国安捷伦公司)。

牛磺酸标准物质(纯度 98%, 美国 Chem Service 公司); 甲醇、乙腈、丹磺酰氯(色谱纯, 美国 TEDIA 公司); 冰乙酸、盐酸、无水碳酸钠、乙酸钠、甲胺盐酸盐、乙酸锌、亚铁氰化钾(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 0.45 μm 滤膜(天津津滕公司)。

样品功能饮料均来自市售超市。

### 2.2 实验方法

#### 2.2.1 溶液配制

牛磺酸标准储备溶液配制: 称取 10 mg 牛磺酸标准物质加水定容至 10 mL 的棕色容量瓶中, 作为牛磺酸标准储备液(1.0 mg/mL)。

碳酸钠缓冲溶液: 称取 0.424 g 无水碳酸钠, 加 40 mL 水溶解, 用盐酸调节 pH 至 9.5, 用水定容至 50 mL。

丹磺酰氯溶液: 称取 0.075 g 丹磺酰氯, 用乙腈溶解并定容至 50 mL。

盐酸甲胺溶液: 称取 1.0 g 盐酸甲胺, 用水溶解并定容至 50 mL。

乙酸钠缓冲液: 称取 4.1 g 乙酸钠, 用水定容至 1000 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

乙酸锌溶液: 称取 9.2 g 乙酸锌, 加入 100 mL 溶解。

亚铁氰化钾溶液: 称取 18.3 g 亚铁氰化钾, 加入 100 mL 溶解。

#### 2.2.2 标准工作曲线与检出限和定量限

用移液管准确吸取上述配制的牛磺酸标准储备溶液, 稀释得到以下浓度: 1.0、10、20、50、100、200 μg/mL。进入高效液相色谱仪, 以溶液浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准工作曲线。得到对应的线性方程, 以及相关系数  $r^2$ 。

以 3 倍的信噪比( $S/N=3$ )对应牛磺酸质量浓度作为方法检出限, 以 10 倍的信噪比( $S/N=10$ )对应牛磺酸质量浓度作为方法的定量限。

#### 2.2.3 样品前处理

从超市购来瓶装功能性饮料, 充分摇匀后, 用移液管准确称取 1.00 mL 于锥形瓶中, 加入乙酸锌溶液 2 mL, 亚铁氰化钾溶液 2 mL, 涡旋混合后转入 50 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度线, 充分混匀, 样品溶液于 5000 r/min 下离心 10 min, 取上清液备用。

准确吸取 1.00 mL 样液的上清液到 10 mL 具塞玻璃试管中, 加入 1.00 mL 碳酸钠缓冲溶液, 1.00 mL 丹磺酰氯溶液, 充分混合, 室温避光衍生反应一定时间, 反应完成后加入盐酸甲胺溶液涡旋混合, 终止反应, 避光静置至沉淀完全后, 取上清液经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 滤液进样 20 μL 于高效液相色谱仪中, 记录峰面积以及保留时间。根据得到的峰形、保留时间来优化实验的流动相比比例、流速、衍生试剂比例以及衍生的时间。

## 3 结果与分析

### 3.1 流动相比比例优化

选用甲醇和乙酸钠溶液作为流动相, 甲醇代替乙腈可以减少毒性。此次实验选用的是 0.10 mg/mL 的牛磺酸标

准溶液, 甲醇和乙酸钠溶液分别选择的体积比是 40:60、45:55、55:45、60:40(V:V)进行实验分析。结果见表 1。随着甲醇的比例增加, 牛磺酸的保留时间不断提前, 峰形变尖锐, 也导致和相邻的色谱峰分离度变差。当甲醇:乙酸钠=40:60(V:V)时, 保留时间过长, 并且峰形矮趴; 当甲醇:乙酸钠=55:60(V:V)和甲醇:乙酸钠=60:40(V:V)时, 峰的保留时间过于提前, 导致和相邻峰保留时间很接近甚至不容易分开, 峰面积不准确而且峰形过于尖锐不美观。综合考虑吸收峰面积、保留时间以及峰形状, 选择流动相甲醇和乙酸钠的比例为 45:55(V:V)。

表 1 流动相比例对牛磺酸测定的影响  
Table 1 Effect of the ratios of mobile phase on detection of taurine

甲醇:乙酸钠(V:V)	峰面积	保留时间/min
40:60	3670219	19.38
45:55	4240954	12.18
55:60	4292680	5.736
60:40	4344076	4.608

### 3.2 流动相流速优化

流动相的流速在检测过程中也是很重要的因素, 流速慢, 会导致目标物保留时间延长, 峰形矮趴; 流速快可以提前保留时间, 但过快的流速也会导致目标物质没有完全被检测到, 导致峰面积减小。选择流动相甲醇和乙酸钠的比例为 45:55(V:V), 考察不同流速对牛磺酸检测的影响, 结果见表 2。由表中可以看出, 每种流速下目标物质都可以很好地和相邻峰分离, 但保留时间随着流速增大而提前, 峰面积随着流速的增大而减小, 综合考虑, 选择最佳流速为 0.8 mL/min。

表 2 流动流速对牛磺酸测定的影响  
Table 2 Effect of the flow rate of mobile phase on detection of taurine

流速/(mL/min)	峰面积	保留时间/min
0.3	13749646	20.22
0.5	8300099	17.18
0.8	4240954	12.18
1.0	3458940	11.79

### 3.3 衍生试剂用量的选择

衍生试剂和目标物质的比例对牛磺酸检测也有一定的影响, 衍生试剂如果过量, 会影响峰形; 衍生试剂过少会导致反应不够完全。此次实验, 选用牛磺酸标准溶液与丹磺酰氯溶液体积比为 1:1、2:1、1:2、1:5(V:V), 通过对比

峰面积以及峰形来确定衍生试剂的用量。结果见表 3。由表中可知, 衍生试剂的量不会改变峰的保留时间, 但是随着衍生试剂的用量增加, 峰面积变小, 而且当目标物与衍生试剂体积比为 1:5(V:V)时, 从色谱中可以明显看到峰出现了分叉峰, 峰形很差, 会导致结果的准确度降低, 说明衍生试剂对峰形确实有很大影响。当目标物与衍生试剂体积比为 2:1(V:V)时, 从峰面积上来看并不是呈现 2 倍的比例, 说明会有一部分目标物质没有完全反应。综上最终选择牛磺酸与衍生试剂的比例为 1:1(V:V)。

表 3 衍生试剂的量对牛磺酸测定的影响  
Table 3 Effect of derivative amount on detection of taurine

牛磺酸:丹磺酰氯(V:V)	峰面积	保留时间/min
1:1	3458940	11.79
2:1	4471804	11.26
1:2	2652554	11.58
1:5	1492092	11.97

### 3.4 衍生时间的选择

牛磺酸本身性质不够稳定, 所以与衍生试剂发生反应的时间也成为了影响牛磺酸检测的重要因素。本次实验选用的衍生时间分别是 0.5、1、2、3 h, 峰面积以及峰保留时间结果见表 4。从表中可以看出峰的保留时间基本一致, 峰面积在 0.5、1、2 h 时变化不是很大, 但是当到达 3 h 时, 峰面积变大, 结合色谱图可知, 衍生时间变长后峰前沿并且拖尾严重, 和基线分离度不高, 最终导致峰面积增加。综合来看, 最终选择衍生时间为 1 h。既能保证衍生反应完全, 又可提高反应时间。

表 4 衍生反应时间对牛磺酸测定的影响  
Table 4 Effect of derivatization time on detection of taurine

衍生反应时间/h	峰面积	保留时间/min
0.5	3420317	11.43
1	3488786	11.41
2	3458940	11.79
3	5099170	11.38

### 3.5 牛磺酸标准曲线方程与检出限和定量限

在最优条件下, 牛磺酸标样的色谱图如图 1 所示。以牛磺酸标液浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准工作曲线, 见图 2。从图中可知, 牛磺酸标液浓度在 1.0~200  $\mu\text{g/mL}$  时, 具有很好的线性关系。其线性回归方程为  $Y=34182X+14599$ , 线性相关系数  $r^2=0.9999$ 。

以 3 倍的信噪比对应牛磺酸的质量浓度为方法的检出限, 经计算得到方法检出限为 0.53 mg/100 g。以 10 倍的

信噪比对应牛磺酸的质量浓度为方法的定量限,经计算得到方法定量限为 1.76 mg/100 g。国标 GB 5009.169<sup>[18]</sup>中给出的方法检出限为 1.5 mg/100 g,说明该实验方法符合测定的要求。

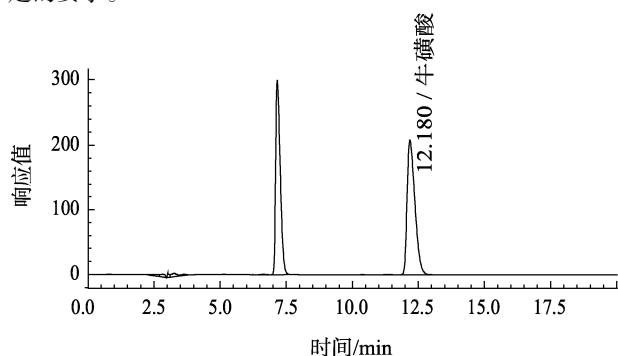


图 1 牛磺酸标准色谱图  
Fig.1 Standard chromatogram of taurine

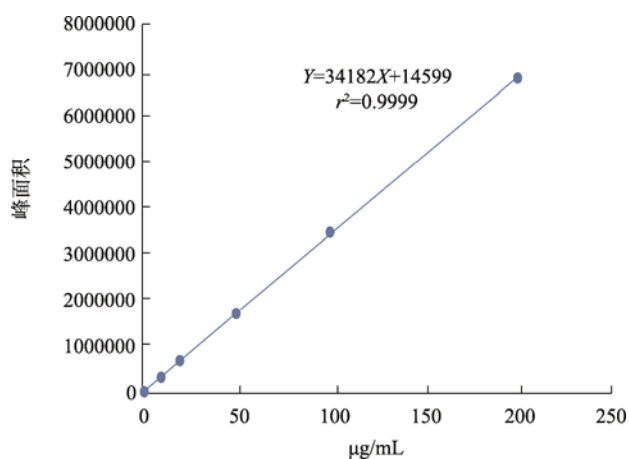


图 2 牛磺酸标准曲线  
Fig.2 Standard curve of taurine

### 3.6 方法精密度实验

对同一批次同一样品用优化后的方法进行多次测定,结果见表 5。由表 5 可知样品溶液测定结果的相对标准偏差为 1.95%,说明优化后的方法的精密度较高,重现性较好。

表 5 精密度实验结果(n=6)  
Table 5 Results of precision test(n=6)

峰面积	平均值	相对标准偏差/%
577775		
585599		
582325	573646	1.95
571819		
554360		
569999		

### 3.7 加标回收实验

按照优化后的实验方法对一瓶市售功能饮料样品进行测定,然后进行 3 个不同浓度水平的加标回收实验,测得的回收率结果见表 6。由表 6 可知,方法的回收率在 96.83%~100.17%之间,相对标准偏差在 1.04%~1.55%之间,说明优化后的方法准确度较好。

### 3.8 实际样品测定

用优化后的实验方法对市售 6 个不同批次的功能饮料进行样品测定,结果见表 7。由表 7 可知,方法测定的结果与标示值较接近,相对标准偏差在 0.65%~1.02%之间,说明该方法的精密度以及准确度较高,可用于测定功能饮料中的牛磺酸含量。

表 6 加标回收实验结果(n=4)  
Table 6 Results of recovery test (n=4)

本底值/mg	加标量/mg	检出值/mg	平均值/mg	回收率/%	平均回收率/%	相对标准偏差/%
		10.02		99.31		
	2.0	9.77	9.85	96.83	97.62	1.18
		9.83		97.42		
		9.78		96.93		
		11.98		99.09		
8.09	4.0	12.02	11.90	99.42	98.39	1.04
		11.77		97.35		
		11.81		97.68		
		17.53		96.90		
	10.0	18.01	17.84	99.56	98.59	1.55
		18.12		100.17		
		17.68		97.73		

表7 样品检测结果( $n=4$ )  
Table 7 Results of sample test( $n=4$ )

样品生产批号	标示值/(mg/100 mL)	检出值/(mg/100 mL)	平均值/(mg/100 mL)	相对标准偏差/%
20180312	201	196.4	199.0	1.02
		200.3		
		198.4		
		200.9		
20180507	201	200.4	200.5	1.01
		197.6		
		202.1		
		201.7		
20180726	201	189.7	191.6	0.92
		192.5		
		193.6		
		190.6		
20180901	201	204.9	203.2	0.69
		203.4		
		201.5		
		202.8		
20181014	201	202.4	200.9	0.65
		199.5		
		200.1		
		201.4		
20181225	201	202.4	201.0	0.77
		200.7		
		198.9		
		201.8		

## 4 结 论

此次实验研究优化了国标第二法检测功能饮料中的牛磺酸,与国标相比,该方法缩短了反应时间,提高了灵敏度,流动相用甲醇代替了乙腈,降低了毒性。该方法易于操作,精密度、准确度和检出限等方面都满足检测需求,测定结果准确,可用于市售功能性饮料中牛磺酸的检测。

## 参考文献

- [1] GB 16740-2014 食品安全国家标准保健食品[S]. GB 16740-2014 National food safety standard-Health food [S].
- [2] 陈秋虹,莫建光,黄艳.天然牛磺酸的提取与应用[J].氨基酸和生物资源,2011,33(2):43-45.  
Chen QH, Mo JG, Huang Y. Extraction and application of natural taurine [J]. Amino Acids Biotic Res, 2011, 33(2): 43-45.
- [3] 刘亚风,袁萍,祝伟霞,等.牛磺酸检测技术研究进展[J].中国卫生检验杂志,2010,20(7):1831-1833.  
Liu YF, Yuan P, Zhu WX, et al. Research progress of taurine detection technology [J]. Chin J Health Lab Technol, 2010, 20(7): 1831-1833.
- [4] 卢忠,罗一帆.中和滴定法测定牛磺酸含量[J].数理医药学杂志,2000,13(4):350.  
Lu Z, Luo YF. Determination of taurine by neutralization titration [J]. J Mathemat Med, 2000, 13(4): 350.
- [5] 杨祖英,张平伟.薄层色谱法测定食品中牛磺酸[J].卫生研究,1996,25(4):248-250.  
Yang ZY, Zhang PW. Determination of taurine in food by thin layer chromatography [J]. J Hyg Res, 1996, 25(4): 248-250.
- [6] 王海澍.高效液相色谱法测定牡蛎中牛磺酸含量[J].食品安全导刊,2017,(3):90.

- Wang HS. Determination of taurine in oyster by HPLC [J]. *China Food Saf Magaz*, 2017, (3): 90.
- [7] 孟冰冰, 杨桂玲, 徐惠, 等. 程序进样-柱前衍生-超高效液相色谱法测定鱼露酱油中的牛磺酸含量[J]. *中国调味品*, 2017, 42(5): 138-140.  
Meng BB, Yang GL, Xu H, *et al.* Determination of taurine in fish sauce by program sampling-precolum derivatization-ultra performance liquid chromatography [J]. *China Condim*, 2017, 42(5): 138-140.
- [8] 黄丽丹, 邢亚东, 王玲玲, 等. 2, 4-二硝基氟苯柱前衍生化 HPLC 法测定保健食品中牛磺酸含量[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(1): 171-175.  
Huang LD, Xing YD, Wang LL, *et al.* Determination of taurine in health food by RP-HPLC with pre-column derivatization [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(1): 171-175.
- [9] 邹晓莉, 黎源倩, 曾红燕, 等. 脉冲安培检测-高效阴离子色谱对药品和保健食品中牛磺酸的快速测定[J]. *分析测试学报*, 2009, 28(4): 470.  
Zou XL, Li YQ, Zeng HY, *et al.* Quick determination of turine in drug and health food by pulse amper detection-high performance anion exchange chromatography [J]. *J Instrum Anal*, 2009, 28(4): 470.
- [10] 康明琴, 陈明岩, 王岸英, 等. UPLC-ELSD 法测定 12 种保健食品中的牛磺酸[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(11): 1957-1961.  
Kang MQ, Chen MY, Wang AY, *et al.* Determination of taurine in health food by ultra-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detector [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2017, 37(11): 1957-1961.
- [11] 陈晓峰, 周围, 解迎双. 超高效液相色谱串联质谱法直接测定婴幼儿乳粉中牛磺酸[J]. *食品科学*, 2015, 36(24): 280.  
Li XF, Zhou W, Xie YS. Direct determination of taurine in infant milk powder by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Food Sci*, 2015, 36(24): 280.
- [12] 薛勇, 薛丰, 孙成均. 功能食品与饮品中牛磺酸的柱前衍生毛细管电泳法快速测定[J]. *分析测试学报*, 2010, 29(4): 386-389.  
Xue Y, Xue F, Sun CJ. Rapid determination of taurine in functional food and beverage by high performance capillary electrophoresis with pre-column derivatization [J]. *J Instrum Anal*, 2010, 29(4): 386-389.
- [13] 王洪健, 周兴起, 冯志强, 等. 氨基酸自动分析仪测定食品中牛磺酸的方法建立[J]. *现代食品科技*, 2012, 28(3): 348.  
Wang HJ, Zhou XQ, Feng ZQ, *et al.* Dtermination of turine in food products by amino acid autoanalyzer [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2012, 28(3): 348.
- [14] 黄岛平, 陈秋虹, 劳燕文. 柱前衍生高效液相色谱法测定红牛维生素功能饮料中牛磺酸含量[J]. *广西科学院学报*, 2006, 22(S): 419-421.  
Zhang RM, Chen QH, Lao YW. Determination of taurine in red bull vitamin energy drink by precolum derivatization high performance liquid chromatography [J]. *J Guangxi Acad Sci*, 2006, 22(S): 419-421.
- [15] 柳小英, 毛丽沙, 鲍敏洁, 等. 高效液相色谱法测定海洋生物中牛磺酸的含量[J]. *安徽农业科学*, 2017, 45(31): 1-3, 11.  
Liu XY, Mao LS, Bao MJ, *et al.* Detection of taurine in marine life by high performance liquid chromatography [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2017, 45(31): 1-3, 11.
- [16] Ubuka T, Okada A, Nakamura H. Production of hypotaurine from L-cysteinesulfinate by rat liver mitochondria [J]. *Amino Acid*, 2008, 35(1): 53-58.
- [17] 叶思平, 陈悦娇, 陈海光, 等. 高效液相色谱测定益智仁中的牛磺酸含量[J]. *食品科学*, 2013, 34(1): 204-206.  
Ye SP, Chen YJ, Chen HG, *et al.* Determination of taurine in alpinia oxyphylla by high performance liquid chromatography [J]. *Food Sci*, 2013, 34(1): 204-206.
- [18] GB 5009.169-2016 食品安全国家标准 食品中牛磺酸的测定[S].  
GB 5009.169-2016 National food safety standard-Determination of taurine in foods [S].

(责任编辑: 韩晓红)

## 作者简介



周欣蕊, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。  
E-mail: 418286167@qq.com



金昱言, 助理工程师, 主要研究方向为食品质量与安全。  
E-mail: 270327349@qq.com